

3. 麻疹ウイルス遺伝子操作系の確立と、複製および病原性発現の分子基盤の解析

竹 田 誠

九州大学・大学院医学研究院・ウイルス学

1990年にKobuneらは、マーモセットBリンパ芽球様培養細胞B95aを用いることにより、病原性を保持した野生型麻疹ウイルスの分離に成功し、従来の麻疹ウイルス研究株が、培養細胞に馴化し、病原性を無くした変異株であることを明らかにした。われわれは、Kobuneらが分離した野生型麻疹ウイルスのゲノムを自由自在に改変する技術を開発し、(1) H蛋白が麻疹ウイルスの細胞指向性を決定づけること、(2) M蛋白が麻疹ウイルスの増殖様式を制御すること、(3) C蛋白が自然免疫の発動を抑制すること、(4) M、F遺伝子の長い蛋白非翻訳領域が宿主細胞の傷害を抑制することを明らかにした。これらの結果により、麻疹ウイルスの培養細胞への馴化の仕組みや、麻疹ウイルスの病原性発現の分子基盤の理解が大いに深まった。

はじめに

個々の感染症の発症メカニズムを理解するためには、その原因となる病原体を特定し、病原体の性質を明らかにすることが不可欠である。1990年にKobuneらは、マーモセットBリンパ芽球様培養細胞B95aを用いることにより、病原性を保持した野生型麻疹ウイルスが分離できることを世界で初めて報告した³⁾。野生型麻疹ウイルスの性質が明らかになるにつれ、1954年に分離され、その後長年にわたり麻疹ウイルスの代表的な研究対象株として用いられてきたEdmonston株が、実は、分離や継代の過程で培養細胞に馴化し病原性を消失した変異株であることが、明らかになった。Edmonston株は、AIK-C株やSchwartz株などわれわれが利用する麻疹生ワクチンの親株として用いられた株である。われわれは、Kobuneらが分離した野生型麻疹ウイルス株の全ゲノム構造を明らかにし、Edmonston株のゲノムとの比較を行った^{15,16)}。しかしながら、半世紀前

に分離されたEdmonston株と、近年分離された野生株のゲノムとの間には約450個の塩基の違いがあり、Edmonston株の培養細胞馴化や、病原性の消失に関わった遺伝子変異を特定することはできなかった。麻疹ウイルスの培養細胞への馴化や病原性発現の分子メカニズムを詳細に解析するためには、病原性をもつ野生型麻疹ウイルスのゲノムに自由自在に変異を導入する技術が不可欠であると考えた。本総説では、われわれが開発した麻疹ウイルス遺伝子操作系を紹介し、本系を用いて明らかにした麻疹ウイルスの複製および病原性発現のためのいくつかの分子メカニズムについて紹介する。

麻疹と麻疹ウイルス

麻疹は、高熱、咳嗽および全身に広がる発赤疹を特徴とする急性ウイルス感染症である。罹患者に一過性の免疫抑制を引き起こすため、細菌性肺炎などの二次感染がしばしば合併する。今でも発展途上国を中心に毎年数千万人が罹患し、数十万人の死亡が報告されている。わが国でも、散発的な流行が続いており、毎年数名から数十名の死亡例の報告がある。さらに感染者約10万人に1人の頻度で、初感染後、約10年を経て致死的な亜急性硬化性全脳炎が発症する。麻疹に対する特異的な治療法はなく、生ワクチンで予防することが重要である。

麻疹ウイルスは、約16k塩基のマイナス極性をもった非分節型一本鎖RNAゲノムを持つウイルスで、モノネガウ

連絡先

〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1
九州大学・大学院医学研究院・ウイルス学
TEL : 092-642-6138
FAX : 092-642-6140
E-mail : mtakeda@virology.med.kyushu-u.ac.jp

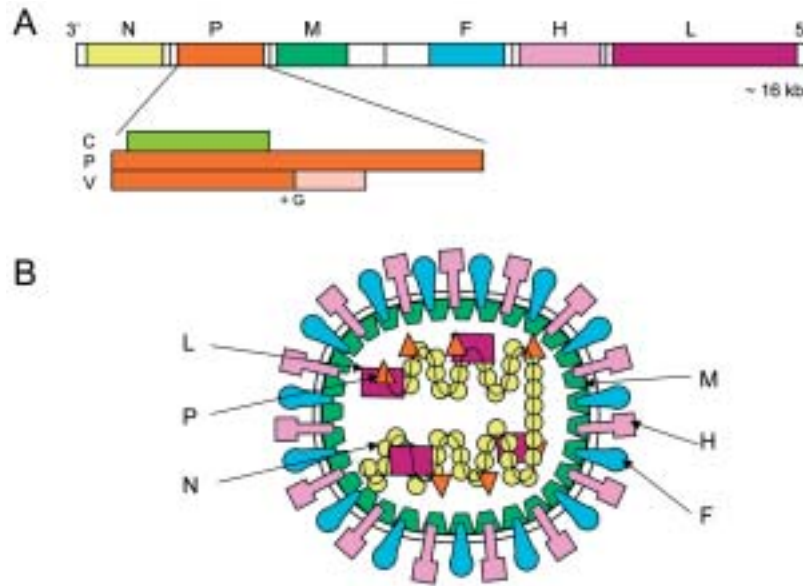


図1 麻疹ウイルスのゲノム構造 (A) と粒子構造 (B)

イルス目パラミクソウイルス科のモルビリウイルス属に分類されている。ゲノムには、3'端の上流から順にN, P, M, F, H, Lの6つの遺伝子が並んでいる。それぞれの遺伝子が、N, P, M, F, H, L蛋白をコードしている (図1A)。P遺伝子だけが、P蛋白と重複した遺伝子領域に、P蛋白とは異なる読み枠を用いてC蛋白を、さらに鋳型にはないグアニンを転写過程でmRNAに挿入することにより (RNA編集)、前半部のアミノ酸配列がP蛋白と同じで、後半部に特有のアミノ酸配列をもつV蛋白をコードしている (図1A)。これらC, V蛋白は、粒子中にはほとんど取り込まれない非構造蛋白と考えられている。N蛋白はゲノムRNAに整然と並んで結合し、らせん対称のヌクレオカプシドを形成する (図1B)。ヌクレオカプシドに包まれたゲノムは、ポリメラーゼを構成するL, P蛋白とともにRNP複合体を形成することにより鋳型活性を発揮することができる。エンベロップ上には、受容体と結合するH蛋白と、膜融合活性をもつF蛋白がスパイク状に並んでいる。M蛋白は、H蛋白やF蛋白の細胞質内ドメイン、そしてRNP複合体と結合することにより、ウイルス粒子形成の中心的な働きを担っている (図1B)。

麻疹ウイルス遺伝子操作系の確立

1994年にSchnellらが、狂犬病ウイルスを用いてモノネガウイルス目のウイルスをcDNAから合成することに世界で初めて成功した¹⁰⁾。翌年にはRadeckeらが、Edmonston株由来のワクチン株をcDNAから合成する系を開発した⁹⁾。改変が自由自在に行えるcDNAからウイルスを得ることができれば、理論上、思いどおりのウイルスを作り出すこと

が可能であり、ウイルスの遺伝子機能の解析が飛躍的に進むことが期待できる。2000年にわれわれは、Kobuneらが分離した野生型麻疹ウイルスIC-B株の完全長cDNAを作成し、そのcDNAから病原性を保持した野生型麻疹ウイルスを回収することに成功した¹⁷⁾。ワクチン株ではなく、野生株の遺伝子操作系を確立することは、病原性研究を推進する上で重要であると同時に、各々の遺伝子の野生株本来の機能を知る上で非常に重要である。しかしながら、当初の野生型麻疹ウイルス合成系は、成功率が非常に低く、変異ウイルスを得ることは容易ではなく、とくに複製能力が低下するような変異を導入する場合には、ウイルスを得ることができず、研究の大きな障害になっていた。2005年に、われわれは、ウイルス合成の効率を格段に高める方法を開発した¹⁸⁾。2006年にさらなる改良を加えることにより、複製能が、数百倍以下に低下した変異麻疹ウイルスでも確実に合成することができる系を確立した^{5,20)}。われわれの系の特徴は、CHO細胞 (あるいはその変異細胞株) とカスパーゼ阻害剤を用いることにより、組換えワクシニアウイルスによるT7 RNAポリメラーゼ (cDNAからT7プロモーター下に麻疹ウイルスゲノムとウイルスmRNAを合成するために用いる) の強力な供給を維持しつつ、ワクシニアウイルスの増殖と細胞傷害を阻止し、麻疹ウイルスだけを効率よく増殖させることにある (図2)。今では、麻疹ウイルスの合成は、基本的な分子生物学的手法を学べば、誰にでもできる非常に簡単な手技になっている。

H蛋白と細胞指向性

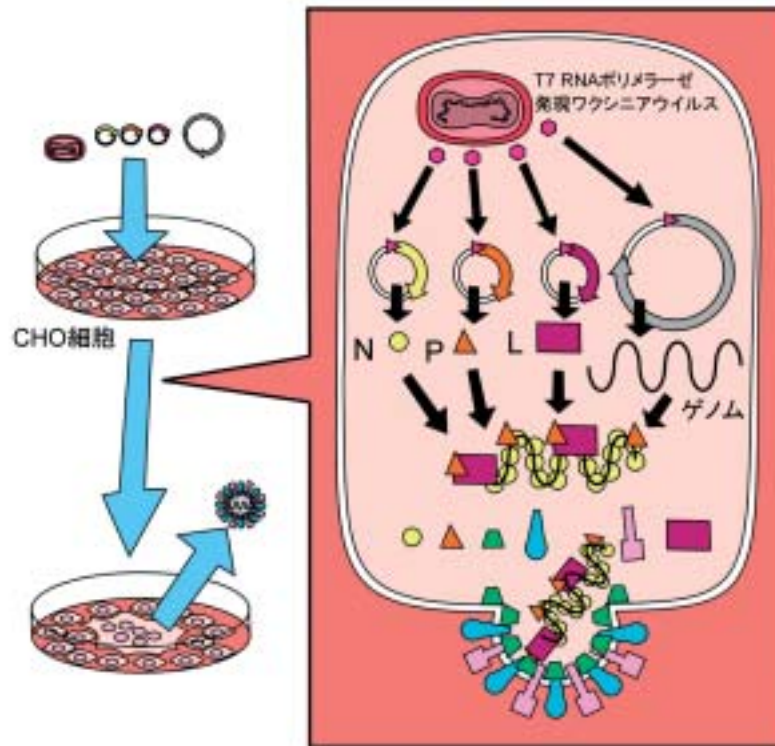


図2 cDNAからの麻疹ウイルスの回収系

CHO細胞（あるいはその変異株）にT7プロモーター下に麻疹ウイルスの全長ゲノムをコードするプラスミドと、同じくN, P, L蛋白をコードするプラスミドを導入する。T7 RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスを感染させることにより、それら麻疹ウイルスのリボ核蛋白複合体（RNP）の構成要素が大量に発現する。ひとたびRNPが形成されると麻疹ウイルスの感染サイクルがはじまる。ワクシニアウイルスは、CHO細胞内では複製を完了することができない特性をもつため、麻疹ウイルスだけを効率よく得ることができる。さらにワクシニアウイルス感染が引き金となるCHO細胞のアポトーシスをカスパーゼ阻害剤で抑えることにより、麻疹ウイルスの回収効率がさらに向上する。本系を用いた麻疹ウイルス回収の成功率は100%である。

野生型麻疹ウイルスは、一部の免疫系細胞でしか増殖しない。一方、Edmonston株は、ヒトやサルほとんど全ての培養細胞で効率よく増殖することができる。このことは、培養細胞でみられるEdmonston株と野生株の最も顕著な違いである²⁵⁾。

Edmonston株を用いた研究から、麻疹ウイルスの受容体は、補体の制御因子であるCD46であることが示されていた^{1,7)}。CD46は、ヒトやサルの全ての有核細胞に発現する分子であり、麻疹ウイルス（Edmonston株）の広い細胞指向性を上手く説明すると考えられてきた。しかしながら、2000年にTatsuoらの研究から、麻疹ウイルスの本来の受容体は、免疫系細胞の一部にのみ発現しているCD150分子（Signaling lymphocyte activation molecule; SLAM）であり、CD46を受容体として用いるEdmonston株の性質は、培養細胞での継代の過程で得られた変異性質であることが明らかになった²⁴⁾。Edmonston株由来のワクチン株のみならず、全てのワクチン株が、CD46を使う性質を獲得し

ている。野生株とワクチン株の細胞指向性の違いは、用いる受容体の特異性の違いで上手く説明できる²⁵⁾。

受容体への結合を担う麻疹ウイルス蛋白はH蛋白である（図1B）。それでは、Edmonston株のH蛋白を持つことにより野生株（IC-B株）は、SLAM陰性培養細胞で本当に増殖するようになるのであろうか？実際に組換えウイルスを作製し解析した結果、Edmonston株のH蛋白をもったIC-B株（IC-B/EdHウイルス）は、Vero細胞などのCD46陽性（SLAM陰性）細胞で効率よく増殖することが明らかになった²¹⁾（図3）。さらに様々な点変異をもった組換えウイルスの解析から、H蛋白の変化が、確かに麻疹ウイルスのSLAM陰性CD46陽性細胞での増殖に貢献していることが明らかになった^{11,13)}。

では逆に、野生株のH蛋白をもったEdmonston株（Edm/ICHウイルス）は、Vero細胞での増殖性を失うのであろうか？Edm/ICHウイルスは、親株のEdmonston株とは異なり、Vero細胞への侵入効率が極端に悪く（Edmonston

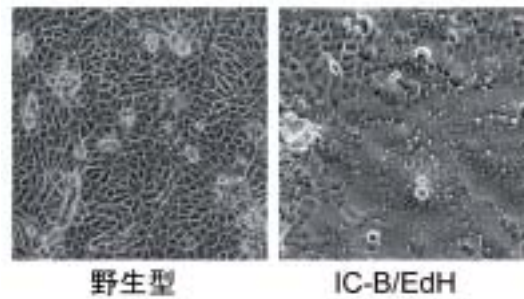


図3 H蛋白による細胞指向性の変化

野生型麻疹ウイルスは、Vero細胞ではほとんど増殖しない。一方、H遺伝子だけをEdmonstonワクチン株のものに置き換えたウイルス(IC-B/EdH)は、巨細胞を形成しながら効率よくVero細胞で増殖する。

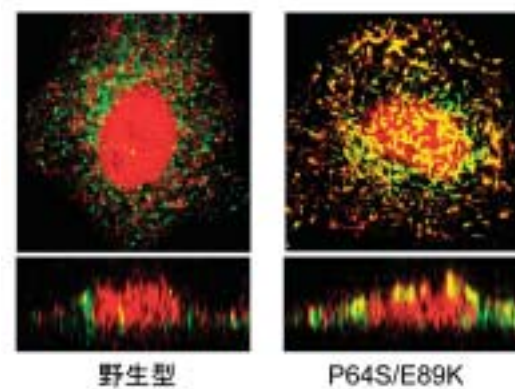


図4 M蛋白の変異とH蛋白との相互作用の変化

野生型のM蛋白(赤)をH蛋白(緑)とともに細胞に発現させても共局在はほとんどみられない。M蛋白にP64SとE89Kの変異を導入すると、M蛋白(赤)とH蛋白(緑)は、顕著な共局在像を示すようになり、細胞膜上にフィラメント状の構造物(黄)を形成するようになる。

株の約1/100)、野生株のH蛋白がVero細胞では十分に機能しないことが裏付けられた。しかし、驚いたことにEdm/ICHウイルスは、細胞への侵入効率が非常に低いにもかかわらず、Vero細胞での高い増殖能を保持していた^{12,21)}。IC-B株は、Vero細胞でほとんど増殖することができない。このことは、H蛋白以外のEdmonston株のウイルス蛋白(あるいは遺伝子領域)が、Vero細胞での高い増殖性に貢献していることを示している。

M蛋白によるウイルス増殖様式の制御

Vero細胞での高い増殖性に関わるH蛋白以外のウイルス蛋白を明らかにするために、Edmonston株の遺伝子のそれぞれを、IC-B株に組み込んだキメラ組換えウイルスを作製して、ウイルスの増殖能を解析した。その結果、M蛋白(特にP64S, E89Kのふたつのアミノ酸置換)やL蛋白の違いによって、Edmonston株がVero細胞での優れた増殖能を獲得していることが明らかになった¹²⁾。

蛍光抗体法と共焦点顕微鏡を用いた解析から、野生型のM蛋白は、F蛋白の細胞質内ドメインと結合するが、H蛋白との結合能は低く、一方、P64S, E89Kの変異をもつM蛋白(M-P64S/E89K)は、F蛋白に加え、H蛋白の細胞質内ドメインと強く結合し、ウイルスの粒子形成を促進することが明らかになった(図4)。しかし、重要なことに、P64S, E89Kの変異をもつM蛋白は、H蛋白とF蛋白による細胞同士の膜融合を阻害することが明らかになった。麻疹ウイルスの増殖様式には(1)子孫ウイルス粒子の生産を介し、新しい感染を繰り返す方法と(2)細胞同士の融合を介して感染を拡大する方法とがある。SLAM陽性細胞では、麻疹ウイルスは、むしろ後者の方法に依存して増殖するため、M蛋白にP64S, E89Kの変異をもったウイルスは、増殖能が低下することが明らかになった。一方、Vero細胞では、前者の様式に依存して増殖するため、P64S, E89Kの変異によって麻疹ウイルスの増殖が増強されていることが示された。このように麻疹ウイルスは、M蛋白に変異を持つこ

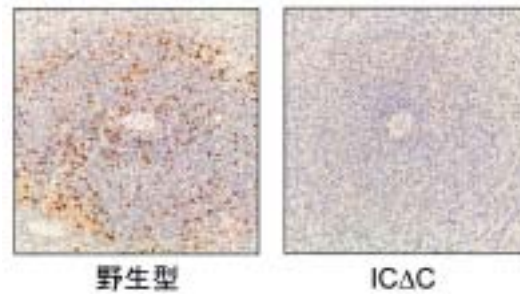


図5 C蛋白ノックアウト麻疹ウイルスの病原性の低下

野生型の麻疹ウイルスをカンクイザルに接種すると、ウイルスは全身のリンパ系臓器で効率よく増殖する。一方、C蛋白の発現を特異的に欠く組換え麻疹ウイルス (ICΔC) を接種しても、麻疹ウイルス抗原陽性細胞は、それらリンパ系臓器でほとんど観察することはできない (画像は麻疹ウイルス感染カンクイザルの脾臓。N蛋白の免疫染色像)。

とにより、H蛋白の細胞質内ドメインとの結合性を調節し、ウイルス増殖様式のバランスを、宿主細胞ごとに絶妙に調節するものと考えられる¹⁴⁾。このような制御は、膜融合を行う多くのウイルスにも存在すると考えられ、興味深い。

アクセサリー蛋白による病原性発現機構

麻疹ウイルスのポリメラーゼ (RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ) は、触媒活性を担うL蛋白と補助的に働くと考えられるP蛋白とで構成されている。Vero細胞に馴化した麻疹ウイルスでは、P蛋白やL蛋白に変異が見られることが多く¹⁵⁾、実際にP遺伝子やL遺伝子の変異が麻疹ウイルスの増殖性を変化させることをわれわれは明らかにした^{4,12)}。詳細なメカニズムについては、現在研究を進めている。

P遺伝子には、P蛋白に重複してC蛋白とV蛋白がコードされている (図1B)。これらふたつの蛋白は、粒子中にほとんど取り込まれず、機能が不明であったため、アクセサリー蛋白と呼ばれてきた。しかし、ゲノム全域にわたる塩基配列の解析から、C蛋白やV蛋白は、麻疹ウイルスの進化の中で、重複してコードされているP蛋白よりも優先的に保存されていることが明らかになった¹⁶⁾。

発現ベクターや恒常発現細胞を用いた解析によって、他の多くのパラミクソウイルスと同様に麻疹ウイルスのV蛋白が、インターフェロンのシグナル伝達を (STATのリン酸化や核内移行を阻害することにより) 阻害する機能を持つことを明らかにした^{8,22)}。一方、C蛋白については、インターフェロンのシグナル伝達を阻害する機能はみられなかった。

遺伝子操作系を用いてC蛋白の発現のみを特異的に欠いたIC-B株 (ICΔCウイルス) を作製した。ICΔCウイルスは、B95a細胞では、比較的良好に増殖し、容易に作出することができた。しかしながら、サルへ感染させたところ、動物個体内では、ほとんど増殖することができず、麻疹ウイルスの病原性発現に必須の蛋白であることが明らかにな

った²³⁾ (図5)。さらに多くの培養細胞を用いた解析からA549細胞など、比較的インターフェロン系が良好に保存されている細胞株では、ICΔCウイルスの増殖が顕著に抑制されることが分かった。ICΔCウイルス感染細胞内では、IRF3などの転写因子の活性化や、翻訳開始因子eIF2 α のリン酸化が強く起こっており、ウイルス遺伝子の転写までは正常に起こるものの、ウイルス蛋白の翻訳が強く抑えられており、結果として感染性ウイルス粒子があまり生産されないことが明らかになった⁶⁾。すなわち、C蛋白は、自然免疫の発動を未然に防ぐ機能を持つと考えられた。

以上の結果から、アクセサリー蛋白と呼ばれてきた麻疹ウイルスのV、C蛋白は、おのおの宿主の自然免疫機構に対抗する機能をもつ病原性発現因子であることが明らかになった。

長い非蛋白翻訳領域による宿主細胞傷害の軽減

麻疹ウイルスのゲノムは、15,894塩基で構成されており、そのうち蛋白をコードする領域は14,169塩基と、実にゲノムの89.1%である (図1A)。麻疹ウイルスは、P遺伝子にみられるように蛋白を重複させてコードするなどして、ゲノムサイズを最小に進化させてきたものと考えられている。しかしながら、麻疹ウイルスのM遺伝子とF遺伝子には、長い蛋白非翻訳領域 (UTR) が存在する (図1A)。おのおの426塩基と583塩基で構成されており、ゲノム上では並んで配置されるため、遺伝子間の3塩基の介在配列を含めて1,012塩基 (ゲノムの6.4%) になる。これらの領域を変化あるいは欠失させた組換えウイルスを作成し、ウイルス増殖や遺伝子発現について解析を行った。その結果、これら長いUTRは、ウイルス増殖には必須でないが、そのおのおのが主には翻訳の段階でM蛋白の発現を促進、またF蛋白の発現を抑制する機能があり、麻疹ウイルスが、高い増殖性を維持しつつ、宿主細胞の傷害性を大幅に軽減することに貢献していることが明らかになった¹⁹⁾ (図6)。長

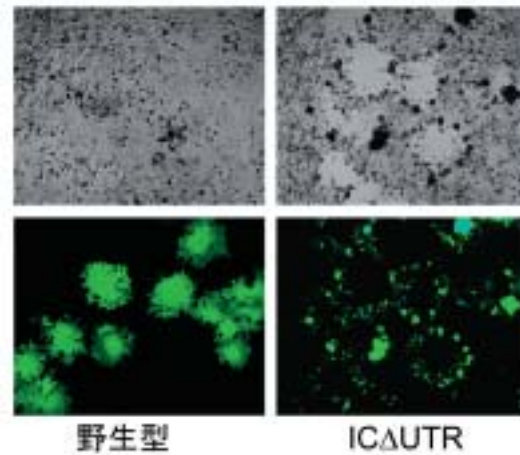


図6 M, F 遺伝子の長い蛋白非翻訳領域 (UTR) の欠失と細胞傷害性の変化

野生型および M, F 遺伝子の長い UTR を欠失させた組換え麻疹ウイルス (ICA Δ UTR) を A549/hSLAM 細胞へ感染させた。各々のウイルスは、EGFP 遺伝子を組み込んでいるため、感染細胞を EGFP の蛍光で観察することができる^{2, 19)}。ICA Δ UTR 感染細胞では、細胞傷害が激しく、多くの感染細胞が脱落している。

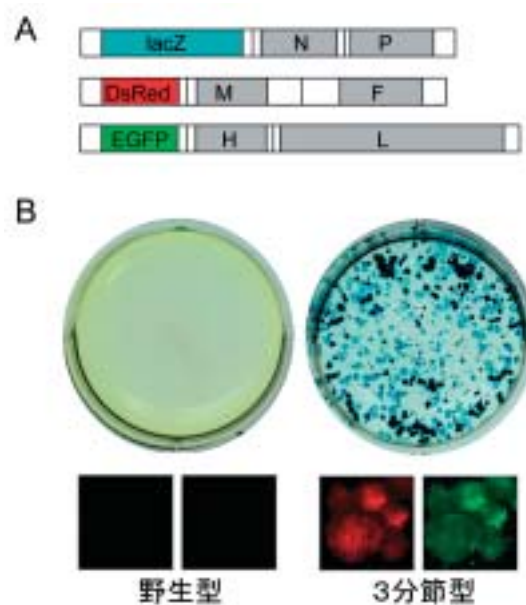


図7 麻疹ウイルスゲノムの分節化

(A) 3分節ゲノム麻疹ウイルスのゲノム構造。分節の各々にはマーカー遺伝子として Lac Z, DsRed2, EGFP 遺伝子を組み込んである。(B) 野生型および3分節ゲノム麻疹ウイルスのプラークの X-gal 染色像と蛍光観察像。

い M, F 遺伝子の UTR は、麻疹ウイルスが自然界に適応し、存続し続けるために必須の領域であったろうと考えられた。モノネガウイルスは、その遺伝子発現の特性から上流の遺伝子ほど、転写量が多くなっている。このように UTR を利用した翻訳段階での蛋白量の調整を麻疹ウイルスが行っていることは、他のモノネガウイルスの UTR の機能を考える上でも重要なことであろう。

非分節ゲノムの分節化

麻疹ウイルスは、モノネガウイルス目に属するウイルスである。モノネガウイルス目の名称は、同目のウイルスのゲノムが非分節の一本 (モノ) のマイナス鎖 (ネガ) RNA であることに由来する。では、麻疹ウイルスのゲノムは、非分節でなければならないのか? その疑問について検討した。麻疹ウイルスのゲノムを2本、または3本の分節に分け、そのおのおのの両末端には、非分節ゲノムのもつプロ

モーター配列を配置した。各分節には、おのおの外來性のレポーター遺伝子を組み込み、各分節のマーカーとした(図7A)。遺伝子操作系を用いて分節ゲノムをもつ麻疹ウイルスの合成を試みたところ、非分節ゲノムをもつ野生型ウイルスと同様に、極めて効率よくウイルスを得ることができた。合成されたウイルスは、培養細胞において優れた増殖性を保持しており、モノネガウイルスゲノムの分節化が可能であることが証明された²⁰⁾(図7B)。インフルエンザウイルスを代表に、マイナス鎖RNAをゲノムにもつウイルスには、分節ゲノムをもつウイルスが存在する。ゲノムの分節、非分節に拘わらずマイナス鎖RNAウイルスには、遺伝子発現の仕組みに類似点があり、遠く同じ祖先をもつものと想像されている。このようにモノネガウイルスゲノムが分節化できるということは、ウイルスの進化を考える上で多くの示唆を与えてくれるものと考えている。

おわりに

麻疹ウイルスは、モノネガウイルスでは、おそらく最も遺伝子操作が簡単なウイルスになった。効率の良い遺伝子操作系が確立できたことにより、多数の変異組換えウイルスの作製を前提とした系統的かつ詳細なウイルスゲノム機能の解析ができるようになった。本総説で紹介したように、麻疹ウイルスのゲノム機能のいくつかについて、ある程度の解答を得ることができた。しかしながら、ウイルスゲノムの機能、そしてウイルス複製や病原性発現の仕組みをより深く掘り下げていくためには、宿主細胞の蛋白や機能に、ウイルスゲノムや蛋白が、どのように相互作用していくかを明らかにしていく必要がある。麻疹ウイルスの研究を通じて、ウイルス増殖や、ウイルス病原性発現の共通原理を解き明かしてゆきたい。

謝 辞

本研究は、1995年から東京大学医科学研究所、国立感染症研究所、九州大学大学院医学研究院に在籍した期間を通じて、永井美之先生、加藤篤先生、竹内薫先生、柳雄介先生の御指導のもとに行ってきた研究です。引用いたしました論文に掲載されております多くの先生と共に推進して参りました。共同研究者の皆様には本研究の一員として参加させて頂きましたことを深く感謝申し上げます。名誉ある日本ウイルス学会杉浦奨励賞に御推薦下さいました柳雄介先生、永井美之先生、倉田毅先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD: The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75: 295-305, 1993.
- 2) Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y: SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J. Virol.* 76: 6743-6749, 2002.
- 3) Kobune F, Sakata H, Sugiura A: Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J. Virol.* 64: 700-705, 1990.
- 4) Miyajima N, Takeda M, Tashiro M, Hashimoto K, Yanagi Y, Nagata K, Takeuchi K: Cell tropism of wild-type measles virus is affected by amino acid substitutions in the P, V and M proteins, or by a truncation in the C protein. *J Gen Virol* 85: 3001-6, 2004.
- 5) Nakatsu Y, Takeda M, Kidokoro M, Kohara M, Yanagi Y: Rescue system for measles virus from cloned cDNA driven by vaccinia virus Lister vaccine strain. *J Virol Methods* 137: 152-5, 2006.
- 6) Nakatsu Y, Takeda M, Ohno S, Koga R, Yanagi Y: Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles virus. *J Virol* 80: 11861-7, 2006.
- 7) Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D: Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* 67: 6025-6032, 1993.
- 8) Ohno S, Ono N, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y: Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J Gen Virol* 85: 2991-9, 2004.
- 9) Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dotsch C, Christiansen G, Billeter MA: Rescue of measles viruses from cloned DNA. *Embo J* 14: 5773-84, 1995.
- 10) Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK: Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *Embo J* 13: 4195-203, 1994.
- 11) Seki F, Takeda M, Minagawa H, Yanagi Y: Recombinant wild-type measles virus containing a single N481Y substitution in its haemagglutinin cannot use receptor CD46 as efficiently as that having the haemagglutinin of the Edmonston laboratory strain. *J Gen Virol* 87: 1643-1648, 2006.
- 12) Tahara M, Takeda M, Yanagi Y: Contributions of matrix and large protein genes of the measles virus Edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. *J Virol* 79: 15218-25, 2005.
- 13) Tahara M, Takeda M, Seki F, Hashiguchi T, Yanagi Y: Multiple amino acid substitutions in hemagglutinin are necessary for wild-type measles virus to acquire the ability to use receptor CD46 efficiently. *J Virol* 81: 2564-72, 2007.
- 14) Tahara M, Takeda M, Yanagi Y: Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemag-

- glutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. *J Virol*, Epub ahead of print on 18 April 2007.
- 15) Takeda M, Kato A, Kobune F, Sakata H, Li Y, Shioda T, Sakai Y, Asakawa M, Nagai Y: Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins. *J. Virol.* 72: 8690-8696, 1998.
 - 16) Takeda M, Sakaguchi T, Li Y, Kobune F, Kato A, Nagai Y. The genome nucleotide sequence of a contemporary wild strain of measles virus and its comparison with the classical Edmonston strain genome. *Virology* 256: 340-50, 1999.
 - 17) Takeda M, Takeuchi K, Miyajima N, Kobune F, Ami Y, Nagata N, Suzaki Y, Nagai Y, Tashiro M: Recovery of pathogenic measles virus from cloned cDNA. *J. Virol.* 74: 6643-6647, 2000.
 - 18) Takeda M, Ohno S, Seki F, Hashimoto K, Miyajima N, Takeuchi K, Yanagi Y: Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. *Virus Res* 108: 161-5, 2005.
 - 19) Takeda M, Ohno S, Seki F, Nakatsu Y, Tahara M, Yanagi Y: Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity. *J Virol* 79: 14346-54, 2005.
 - 20) Takeda M, Nakatsu Y, Ohno S, Seki F, Tahara M, Hashiguchi T, Yanagi Y: Generation of measles virus with a segmented RNA genome. *J Virol* 80: 4242-8, 2006.
 - 21) Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Kobune F, Tanabayashi K, Tashiro M: Recombinant wild-type and Edmonston strain measles viruses bearing heterologous H proteins: role of H protein in cell fusion and host cell specificity. *J Virol* 76: 4891-900, 2002.
 - 22) Takeuchi K, Kadota SI, Takeda M, Miyajima N, Nagata K: Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett* 545: 177-82, 2003.
 - 23) Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Ami Y, Nagata N, Suzaki Y, Shahnewaz J, Kadota S, Nagata K: Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *J Virol* 79: 7838-44, 2005.
 - 24) Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y: SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406: 893-897, 2000.
 - 25) Yanagi Y, Takeda M, Ohno S: Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* 87: 2767-79, 2006.

Reverse Genetics System for Measles Virus: Establishment and Applications for Analysis of Virus Replication and Pathogenesis

Makoto TAKEDA

Department of Virology, Faculty of Medicine, Kyushu University,
Fukuoka 812-8582, Japan.
mtakeda@virology.med.kyushu-u.ac.jp

In 1990 Kobune et al. succeeded in isolating pathogenic wild-type strains of measles virus (MV) using a marmoset B-lymphoblastoid cell line B95a. Their data indicated that MV strains that have been used in laboratories are attenuated strains through the adaptation to grow in a variety of cultured cells. We have established a very efficient reverse genetics system that allows us to engineer the genome of a wild-type MV strain at will by site-directed mutagenesis or recombination. Using the system it was shown that (1) the H protein determines tropism of MV, (2) the M protein regulates mode of MV spread, (3) the C protein inhibits host innate immune responses, and (4) the long untranslated regions in the M and F genes function to moderate cytopathogenicity by MV. These data advanced our understanding of molecular bases for MV pathogenicity and mechanisms of MV adaptation to grow in cultured cells.